

特別企画

● 癌免疫療法の効果判定法について ●

皮内反応は腫瘍抗原に対する特異的免疫反応と 臨床効果の指標になるか

*¹ 東京女子医科大学消化器病センター・外科, *² 東京女子医科大学大学院医学研究科・がん免疫細胞治療学

清水 公一*¹ 竹下 信啓*¹ 小寺 由人*¹
山本 雅一*¹ 高崎 健*¹ 有賀 淳*²

要旨 自己腫瘍抽出抗原をパルスした樹状細胞癌ワクチン療法と自己リンパ球移入療法の併用療法を行い、自己腫瘍抽出抗原に対する皮内反応の有無が、特異的免疫反応と臨床効果の指標になるかどうかを検討した。併用療法施行後、皮内反応が陽性化すると、末梢血液中のリンパ球数(%リンパ球)が増加し、増加したリンパ球の主体はT細胞であった。増加したT細胞は自己腫瘍抽出抗原特異的にサイトカインを産生する細胞集団であった。皮内反応陽性化と同時に認められた、末梢血液中のリンパ球やT細胞の増加、T細胞からの自己腫瘍特異的なサイトカイン産生増加は、皮内反応が減弱・陰性化すると併用療法前のベースラインに戻った。肝細胞癌術後の補助免疫療法として、併用療法を施行し皮内反応が陽性化した群では、無再発生存期間の延長が認められた。皮内反応が腫瘍抗原に対する特異的免疫反応と臨床効果の指標になることが推測された。

[Biotherapy 20 (2) : 190-196, March, 2006]

Can DTH Responses to Tumor Lysates *In Vivo* Predict Tumor Lysate-Specific Immune Responses and Clinical Responses?

Koichi Shimizu*¹, Nobuhiro Takeshita*¹, Yoshihito Kotera*¹, Masakazu Yamamoto*¹,
Ken Takasaki*¹ and Atsushi Aruga*²

*¹Department of Gastroenterological Surgery, Institute of Gastroenterology, *²Cancer Immunotherapy and Cell Therapy, Graduate School of Medicine, Tokyo Women's Medical University

Summary

We sought to determine the correlation of delayed-type hypersensitivity (DTH) responses to tumor lysates *in vivo* with immune responses to lysates *in vitro* and clinical responses. Patients received tumor lysate-pulsed dendritic cells (TP-DC) intradermally with T cells activated with interleukin-2 and antibody to CD3 (AT) intravenously 4 times at 2-week intervals. After the final treatment, patients with positive DTH to tumor lysates revealed an increase in the number of peripheral blood lymphocytes (PBL) compared to those with negative DTH. An increase in the number of T cells in PBL was observed in patients with positive DTH. Furthermore, patients with positive DTH revealed significant IFN-gamma production by T cells stimulated with TP-DC. The duration of positive DTH was within 6 months after the final treatment correlated with the decrease in the number of PBL *in vivo* and the decrease in the production of IFN-gamma *in vitro* by T cells. In adjuvant settings for hepatocellular carcinoma, patients with positive DTH experienced less tumor relapse compared to those with negative DTH. A significant correlation among the number of PBL, the DTH responses and clinical responses was observed. DTH responses could be a useful guide to assess patients by immunological and clinical evaluation.

Key words : Dendritic cell, DTH, Immune response, Clinical response

Address request for reprints to : Dr. Koichi Shimizu, Apt. 501 Domiru-shu, 10-16 Inari-dai, Itabashi-ku, Tokyo 173-0002, Japan

はじめに

同定された人工抗原ペプチドや自己腫瘍抽出抗原（以下、ライセート）をパルスした樹状細胞癌ワクチン療法の臨床試験が国内外で行われている。臨床試験ではいろいろな測定方法で、生体内 (*in vivo*) で抗原特異的免疫反応が誘導されているかどうかを検討されている。われわれの施設では、ライセートをパルスした樹状細胞癌ワクチン療法（以下、TP-DC）と自己リンパ球移入療法（以下、AT）の併用療法（以下、ATVAC）を施行し、生体内での腫瘍（抗原）特異的免疫反応の検出を試みており、また免疫反応と臨床効果が関連するかを検討している。

I. 免疫反応の検出

in vivo での免疫反応の検出は、3か所の部位で行われている。ライセートをパルスした樹状細胞癌ワクチン療法では（図1）、投与された樹状細胞は所属リンパ節へ遊走し、リンパ節内で腫瘍抗原をT細胞に提示し、腫瘍抗原特異的T細胞を誘導する。1か所目の検出部位は末梢血液である。誘導された腫瘍抗原特異的T細胞は末梢血液中に流れだしてくるので、ELISPOTや古典的なサイトカイン産生測定、セルライン化した自己腫瘍株を標的とした細胞傷害性試験などで、末梢血液中にどれくらい腫瘍抗原特異的T細胞が混じっているかを *in vitro* で測定する。2か所目の

検出部位は皮膚である。皮膚での delayed-type hypersensitivity (DTH) テストで皮膚反応を測定する。測定の簡便さから、汎用されている。3か所目の検出部位は腫瘍内部である。腫瘍を摘出あるいは生検して組織を得て、腫瘍細胞内にどの程度免疫担当細胞（主としてT細胞）が集積しているか、あるいは腫瘍浸潤リンパ球を培養して、腫瘍抗原特異的なサイトカイン産生や細胞傷害活性が認められるかを測定する。

II. 方法

1. 患者

進行消化器癌患者を対象に、インフォームド・コンセントで同意が得られた後、外科切除にて腫瘍組織を十分量摘出し、遺残した測定可能病変に対してあるいは術後の補助治療として、ATVACを施行した。

2. 治療スケジュール

成分採血装置を使用して患者から末梢血単核球を採取し、標準的方法で樹状細胞と自己リンパ球を誘導した。第I相、第II相臨床試験では採血1週間後にATVACを施行した。樹状細胞は鼠径部に皮内注射、自己リンパ球は点滴静注した。1週ごとに採血と治療を繰り返し、計4回の投与を行った。肝細胞癌を対象とした第II相臨床試験では、進展因子や肝内転移を伴いやすい単純結節周囲増殖型の患者で、治療切除後にATVACを施行した。

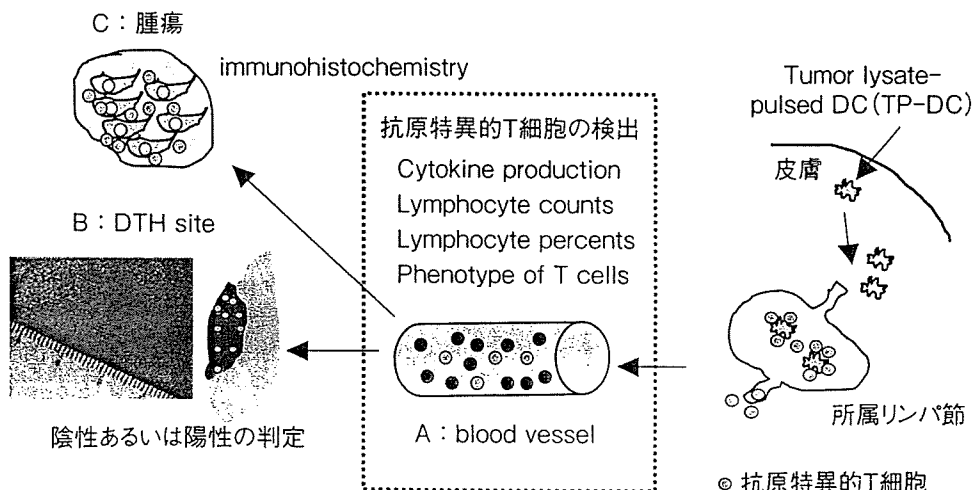
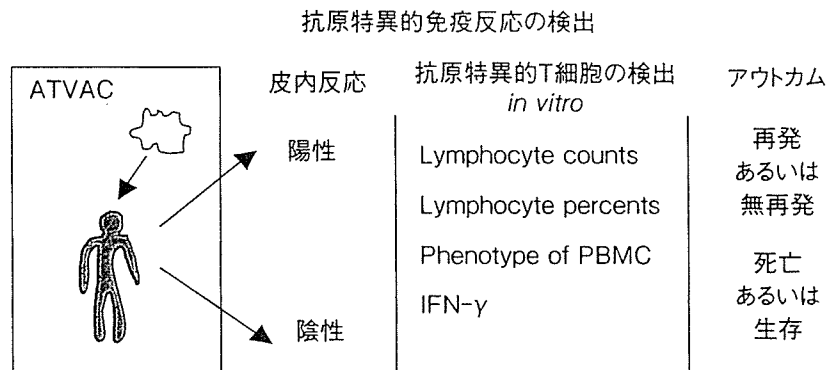


図1 免疫反応の検出



■ *In vitro*での抗原特異的T細胞の検出と皮内反応がどのように関係してくるのか?
 ■ 皮内反応はアウトカムと関係してくるのか?

図2 検討方法

表1 結果 (ATVAC: 第I相臨床試験)

DC dose	n	Positive DTH (lysates)	Positive DTH (KLH)	Adverse events	
				Fever	Skin
10 ⁶	4	0/4	0/4	0/4	0/4
2×10 ⁷	7	1/7	4/7	0/7	4/7
10 ⁸	16	13/16	16/16	4/16	16/16
		Positive 14 pts	Negative 13 pts		

3. 測定スケジュール

4回目のATVAC投与終了後、1か月 (post), 3か月, 6か月, 12か月後に特異的免疫反応の有無, 皮内反応, 臨床効果を測定・検討した。

4. 測定・検討項目 (図2)

1) 末梢血液中のリンパ球

末梢血液を採取し, 血液中のリンパ球分画 (絶対数と%), リンパ球の細胞表面マーカーを調べた。

2) DTH反応 (皮内反応)

ライセートを皮内に注射し, 48時間後に皮内反応を測定した。皮膚の硬結を測定し長径5 mm以上を陽性とした。

3) サイトカイン産生

患者末梢血単核球 (PBMC) を採取し, ライセートをパルスした自己樹状細胞あるいはアンパルスした樹状細胞と混合培養し, 上清を回収してIFN-γ産生をELISA法にて測定した。

4) 無再発生存期間 (DFS)

単純結節周囲増殖型の肝細胞癌では, 治癒切除後にATVACを施行し, 再発抑制効果があるかを検討した。外科切除後3か月に1回, 超音波検査あるいはCT検査と腫瘍マーカー検査で再発をチェックした。

III. 結果

1. 皮内反応と末梢血液中リンパ球の増加には関係がある

ATVACの第I相臨床試験では, 用量試験として1×10⁶個, 2×10⁷個, 1×10⁸個の樹状細胞を投与して, 皮内反応と末梢血液中のリンパ球を測定した。表1のように, 27例中14例で皮内反応が陽性となり, 13例で皮内反応が陰性であった。陽性群と陰性群で, 末梢血液中のリンパ球分画がどのように変化しているかを検討すると, 図3のように陽性群では陰性群と比較して有意に%

リンパ球（絶対リンパ球数）が増加していた（陽性群：治療前 24.9%，治療後 44.8%，陰性群：治療前 24.2%，治療後 29.3%， $p < 0.0001$ ）。

2. 皮内反応の減弱・陰性化と末梢血液中のリンパ球の減少には関係がある

皮内反応の有無と末梢血液中の%リンパ球（絶対リンパ球数）に関係があるか、さらに検討した。外科切除後の補助治療として ATVAC を投与して、皮内反応が陽性化した無再発症例で、4 回の投与終了 1 か月、3 か月、6 か月、12 か月後に皮内反応と末梢血液中リンパ球を測定した（図 4）。6 例で検討したところ、1 例を除き投与終了

後 12 か月以内に皮内反応は陰性化した。陽性の 1 例も皮内反応は減弱化した。皮内反応の減弱・陰性化に伴い、末梢血液中の%リンパ球（絶対リンパ球数）は減少し、ATVAC 治療前のベースラインに戻った（図 5）。以上のことから、皮内反応の有無と末梢血液中の%リンパ球（絶対リンパ球数）の増加が関係していることがわかった。

3. 末梢血液中のリンパ球の増加は T 細胞が主体である

皮内反応が陽性化した群では、末梢血液中の%リンパ球（絶対リンパ球数）が増加していることから、リンパ球のうちどのサブセットが増加しているかをフローサイトメトリーで調べた（表 2）。陽性群では T 細胞が 50.9% から 75.2% に増加していた。一方、陰性群では T 細胞は 52.8% から 47.3% で増加は認められず、皮内反応陽性群では増加しているリンパ球の主体は T 細胞であることがわかった。

4. 増加した T 細胞はライセート特異的な細胞集団である

末梢血液中に増加している T 細胞が、ライセート特異的な細胞集団を含んでいるかどうかを検討した。ATVAC 治療前の患者 PBMC と治療後の PBMC を、ライセートをパルスした樹状細胞、あるいはアンパルスの樹状細胞と混合培養して、PBMC から産生される IFN- γ の量を比較した。皮内反応陽性である患者 12 の PBMC は、治療前より治療後で多量の IFN- γ を産生した（図 6）。

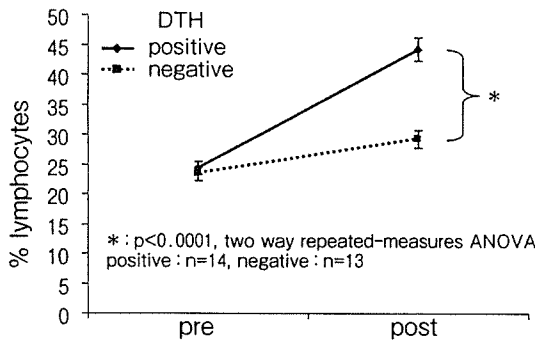


図 3 皮内反応陽性群ではリンパ球分画，リンパ球数は増加した

Pts with the positive DTH to tumor lysates after the fourth treatment revealed the increase in the number of PBL compared to those with the negative DTH (from 24.9% to 44.8% vs from 24.2% to 29.3%, respectively; $p < 0.0001$).

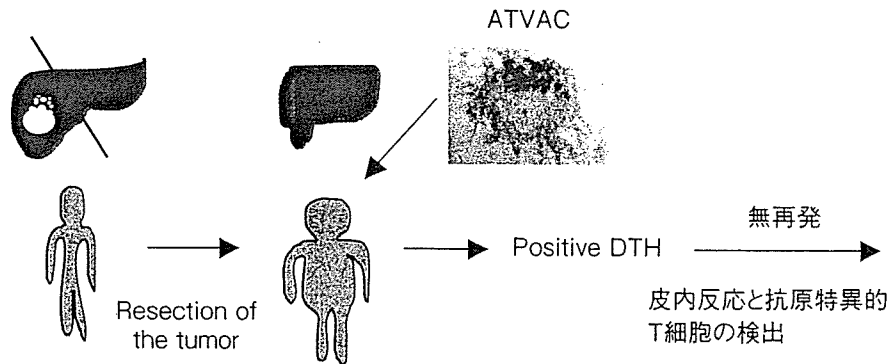


図 4 皮内反応陽性群では、皮内反応と抗原特異的 T 細胞群は計時的にどのように変化していくだろうか（免疫記憶の検出）

Patients who had had primary tumor(s) underwent tumor resection. After the resection of the tumor(s), pts received TP-DC/CAT 4 times as described. Pts with the positive DTH were followed every 3 months after the final treatment. Immunologic and DTH responses (T cell-memory) were assessed in pts with no relapse.

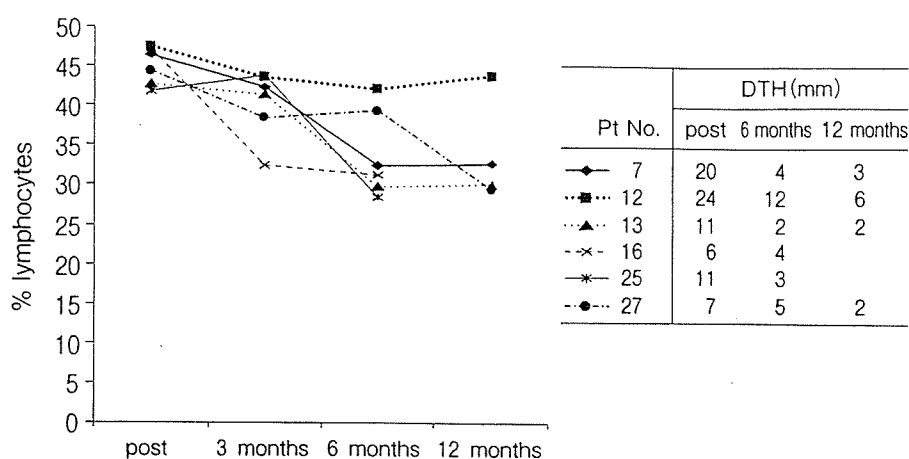


図5 陽性群では、最終治療後6か月以内に皮内反応が陰性化し、リンパ球分画・リンパ球数が減少した
In 4 of 6 pts with the positive DTH, the duration of the positive DTH was within 6 months. A significant correlation between the number of PBL and the DTH responses was observed. Twelve months after the final treatment, 5 of 6 pts who had previously experienced the positive DTH revealed the negative DTH with the decrease in the number of PBL.

表2 皮内反応陽性群で増加したリンパ球はT細胞が優位であった

	DTH reactivity to autologous tumor			
	Positive (14 pts)		Negative (13 pts)	
	Pre-vac	Post-vac	Pre-vac	Post-vac
% lymphocytes	24.4±1.1%	44.2±2.0%	23.4±1.2%	29.2±1.5%
% T cells	50.9±1.2%	75.2±2.2%	52.8±1.5%	47.3±1.3%
% B cells	22.1±1.0%	11.0±1.1%	20.5±1.3%	18.2±0.9%

The significant increase in the number of T cells as well as PBL was evident in patients with the positive DTH as compared with those in patients with the negative DTH.

一方、皮内反応が陰性の患者19のPBMCでは、治療後もIFN- γ 産生は増加しなかった。他の陽性患者でも同様の傾向が認められた。以上のことから、皮内反応陽性群では末梢血液中にT細胞主体のリンパ球増加が認められ、増加しているT細胞はライセート特異的な細胞集団であることがわかった。さらに患者13で、皮内反応とPBMCから産生されるIFN- γ の量を計時的に測定した。ATVACが4回投与終了後、患者13は皮内反応が陽性を示し、治療前と比較して高い量のIFN- γ 産生が認められた。治療3か月後、6か月後で皮内反応が減弱し陰性化すると、IFN- γ 産生も低下し、治療前のベースライン量にほぼ戻った(図7)。以上のことから、皮内反応は患

者PBMC中のライセート特異的T細胞集団の増加を反映し、T細胞集団が減少すると皮内反応も減弱・陰性化することがわかった。

5. 皮内反応は臨床効果と関係がある

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) を対象に、進展因子や肝内転移を伴いやすく再発リスクの高い単純結節周囲増殖型のHCC (stage III or step 2) の外科切除後にATVACを施行し、皮内反応が陽性化することで、再発抑制が得られているかを検討した(図8)。図9のように、手術単独群では、median disease-free survival (MDFS) は16か月(95% CI 10~22か月)、clinical controlの単純結節型では、MDFSは42か月(95% CI 12~72か月)、手術プラス

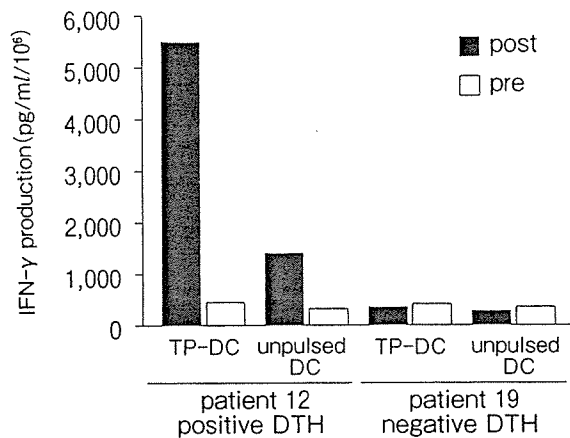


図6 皮内反応陽性群で増加したT細胞は、抗原(ライセート)特異的にIFN-γを産生した
 2×10^6 PBMC were added to 24-well plates with either 1×10^5 TP-DC or unpulsed DC in AIM-V medium supplemented with 2% autologous serum. Cells were incubated for 48 hours and then supernatants were collected to measure the IFN-γ production by T cells.

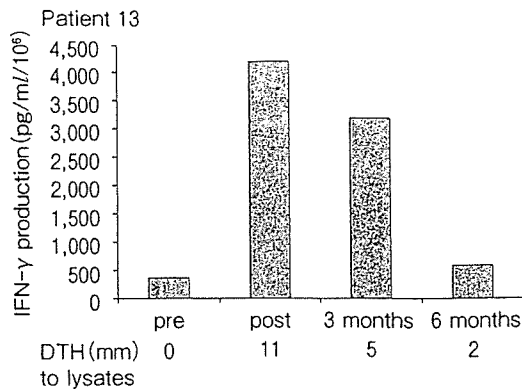


図7 皮内反応が陰性化しリンパ球数がベースラインレベルまで減少すると抗原(ライセート)特異的IFN-γ産生は減少した
 Every 3 months after the final treatment, immunologic and DTH responses were followed in pt 13 with the positive DTH. The decrease of the IFN-γ production by T cells correlated with the decrease of the DTH response was evident.

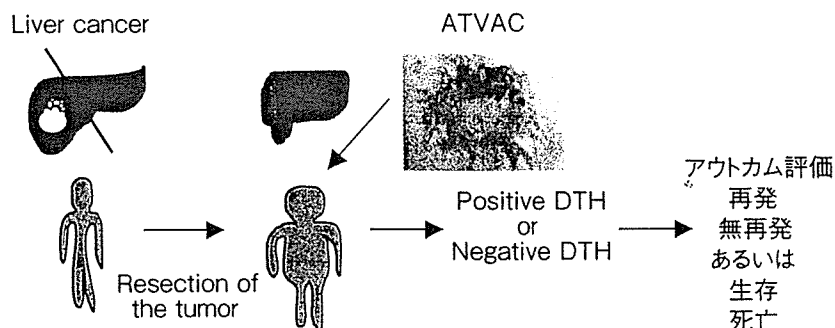


図8 ATVAC: 第II相臨床試験

Patients who had had primary liver cancer underwent liver resection. After the resection of the tumor(s), pts received ATVAC. Pts were followed to assess the DTH responses and the clinical outcome.

ATVAC群(陽性群)は、MDFSはnot reachedで手術単独群と比較して $p=0.0269$ で、単純結節型とほぼ同等のDFSを示した。以上のことから、皮内反応の有無は臨床効果と関係があることがわかった。

IV. 考 察

癌治療の効果判定は、臨床医が患者に最適な治療を判断、選択、提供するために必要な基準である。手術不能あるいは転移性進行癌では、奏効率、time to progression (TTP)や全生存期間(OS)が効果判定の基準である。また外科切除後

であれば、OSやDFSが効果判定の基準となる。OSを延長させることが「真の臨床効果」であるので、真の臨床効果と強い相関を示すものが、サロゲートマーカーとして臨床効果を予測する指標となる。

同定された人工抗原ペプチドをパルスした樹状細胞癌ワクチン療法では、末梢血液中にペプチド特異的なT細胞を検出・増加が認められ、特異的免疫反応が誘導された報告が多い。しかし、標準的治療(化学療法や放射線療法など)が無効である進行癌を対象に臨床試験が施行されているため奏効率は極めて低く、またTTPやOSの延長

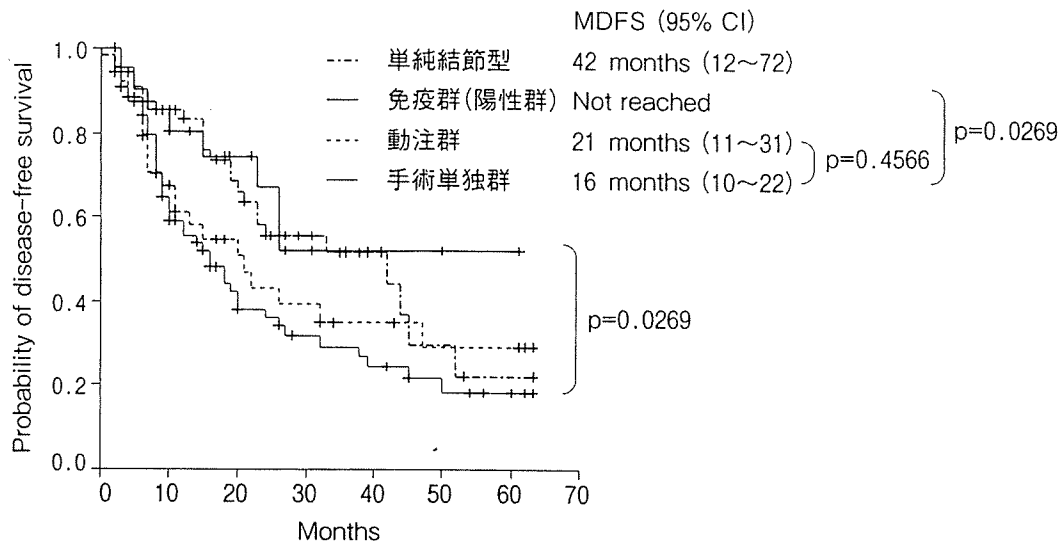


図9 肝細胞癌術後の補助免疫療法で皮内反応が陽性化した群では、手術単独群と比較して無再発生存期間の延長が認められた

を証明する試験デザインになっていないため、特異的免疫反応が臨床効果の指標になるかを明確に示した報告は少ない。

ライセートをパルスした樹状細胞癌ワクチン療法では、抗原エピトープが同定されていないため、特異的免疫反応が誘導されているかは皮内反応や ELISPOT、サイトカイン産生試験で測定している。皮内反応は、肉眼的に医療側、患者側ともに確認でき簡便であることから、臨床現場で使用するには便利である。

われわれの施設は、ライセートをパルスした樹状細胞癌ワクチンと自己リンパ球移入を併用した ATVAC の臨床試験を施行し、皮内反応が特異的免疫反応の指標になるかをまず検討した。皮内反応陽性群では、末梢血液中の%リンパ球（絶対リンパ球数）が増加しており、増加したリンパ球の主体はライセート特異的な T 細胞集団であった。皮内反応の陽性化、減弱・陰性化と、%リンパ球やライセート特異的 T 細胞集団の増減はよ

く関係していた。したがって、皮内反応が特異的免疫反応のよい指標になることがわかった。

次に、肝細胞癌を対象に再発予防補助治療として ATVAC の臨床試験を施行し、皮内反応陽性群で DFS の延長が認められたので、皮内反応が臨床効果のよい指標になることが推測された。

今回の検討で、皮内反応陽性化が特異的免疫反応とよく相関し、かつ DFS の延長という臨床効果ともよく相関したことから、皮内反応陽性化を治療継続の目安とする可能性が示された。

今後、OS の延長をエンドポイントとする臨床試験をデザインすることで、現在測定されているいろいろな特異的免疫反応が臨床効果とよく相関することが証明されることが考えられる。

おわりに

臨床現場で簡単に測定できる皮内反応が、特異的免疫反応と臨床効果の指標となる可能性が示された。

原 著

バイオセラピーにおける QOL 評価のための調査票 — FACT-BRM 日本語版の開発 —

*¹ 東日本橋免疫療法研究会, *² 流通科学大学・サービス産業学部・医療福祉サービス学科, *³ 国立国際医療センター・緩和ケア科,
*⁴ Center on Outcomes, Research, and Education, Evanston Northwestern Healthcare

有賀 淳*¹ 下妻晃二郎*² 寺島 雅典*¹ 河野 浩二*¹
有賀 悦子*³ David Cella*⁴ Sonya Eremenco*⁴ 田原 秀晃*¹

要旨 本邦にてバイオセラピーを受けた癌患者における生活・生命の質 (quality of life, QOL) を解析するために、米国 Cella らにより開発された QOL 調査票 FACT-BRM の日本語版を開発した。版權元の FACIT 多言語版開発要綱ののっとり日本語翻訳過程を経て FACT-BRM 日本語版原案を作成し、本邦にてバイオセラピーを受けている日本人癌患者 15 名 (男性 9 名, 女性 6 名) に対して QOL アンケート調査のパイロット試験を実施した。年齢は 36~81 歳, performance status (PS) は 0 が 8 名, 1 が 6 名, 3 が 1 名であった。すべての質問事項は理解しやすく, 関連のない質問事項や不快感を抱かせる質問事項はあげられなかった。パイロット試験の結果解析を経て, FACT-BRM 日本語翻訳版が完成した。今後, 本邦のバイオセラピーにおける信頼性と妥当性を検討する必要があるが, FACT-BRM 日本語翻訳版はバイオセラピー実施癌患者における QOL 評価のための有用な調査票となることが期待される。

[*Biotherapy* 20 (2) : 217-222, March, 2006]
(Received December 21, 2005/Accepted January 6, 2006)

Development of the Japanese Version of Functional Assessment of Cancer Therapy-Biological Response Modifier (FACT-BRM)

Atsushi Aruga*¹, Kojiro Shimozuma*², Masanori Terashima*¹, Koji Kono*¹, Etsuko Aruga*³,
David Cella*⁴, Sonya Eremenco*⁴ and Hideaki Tahara*¹

*¹Eastern Network of Cancer Immunological Therapy, *²Department of Healthcare and Social Services, Faculty of Service Industries, University of Marketing and Distribution Sciences, *³Division of Palliative Care, International Medical Center, *⁴FACIT Multilingual Translational Program, Center on Outcomes, Research, and Education (CORE), Evanston Northwestern Healthcare

Summary

To assess the quality of life (QOL) in cancer patients who received biological therapy, the Japanese Version of the Functional Assessment of Cancer Therapy-Biological Response Modifier (FACT-BRM) was developed through an iterative forward-backward translation sequence used throughout the FACIT Translation Project Procedures and Guidelines. The pilot testing of the Japanese version of FACT-BRM was done for 15 patients (9 men ; 6 women) with the patients who received biological therapy in Japan. Their age ranged from 36 to 81. Eight patients had a performance status (PS) of 0, 6 had a PS of 1, and 1 had a PS of 3. Questionnaire items were found easy to understand, and none were irrelevant or offensive. After the analysis of the results of the pilot study, the Japanese version of the FACT-BRM was finalized. Reliability and validity of the FACT-BRM remain to be evaluated, and the Japanese version of FACT-BRM can be an effective tool to measure QOL in cancer patients receiving biological therapy.

Key words : Quality of life, Biotherapy, FACT-BRM, Outcomes

Address request for reprints to : Dr. Atsushi Aruga, Department of Gastroenterological Surgery, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

はじめに

近年、癌治療の効果判定基準において、患者の生活・生命の質 (quality of life, QOL) を評価することが重要視されている。QOL の判定には患者の outcomes を客観的に評価する尺度が必要であり、米国 Evanston Northwestern Healthcare の Center on Outcomes, Research, and Education (CORE) で開発された Functional Assessment of Cancer Therapy (FACT)¹⁾ や European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire-Core 30 (EORTC QLQ-C30)²⁾ などの調査票が国際的な QOL 評価尺度として広く利用されている。本邦では厚生省 (現、厚生労働省) 「がん薬物療法の合理的評価法に関する研究班 (栗原班)」による Quality of Life Questionnaire for Cancer Patients Treated with Anticancer Drugs (QOL-ACD)³⁾ が抗癌剤投与を受けた患者における QOL 調査票として開発され普及している。これらの調査票のなかには、FACT スケールのように、全般的項目の調査票である FACT-G (general) に疾患別もしくは治療法別に特化したサブスケールを追加した調査票も開発されている。たとえば、肺癌患者に対する FACT-L (lung cancer)⁴⁾、乳癌患者に対する FACT-B (breast cancer)⁵⁾ など、その多くは日本語に翻訳されて本邦でも利用されている。バイオセラピーを受けた患者における QOL 評価に特化した調査票としては、米国 Cella らにより開発された FACT-BRM (biologic response modifier) が開発されている⁶⁾ が未だ日本語翻訳版が存在せず、本邦での利用が不可能であった。FACT-BRM を日本で利用するためには英語原版を日本語へ翻訳する作業が必要であるが、そのためには著作権元の米国 CORE が定める Translational Project Procedures and Guidelines にのっとった翻訳作業過程を経て翻訳版 (原案) を作成し、その原案を用いてバイオセラピーを受

けている 10 例以上の癌患者を対象としたアンケート調査のパイロット試験を実施して翻訳された質問事項の適切性を評価することが必要となる。今回、本邦におけるバイオセラピー実施患者の QOL 評価に特化したアンケート調査票を開発する目的にて東日本癌免疫療法研究会 (会長 田原秀晃・東京大学医科学研究所外科教授) により FACT-BRM の日本語版翻訳作業が行われ、福島県立医科大学、山梨大学医学部、東京女子医科大学にてパイロット試験を実施し、FACT-BRM 日本語版を開発した。

I. 対象・方法

FACT-BRM 英語原版から他言語への翻訳は Functional Assessment of Chronic Illness Therapy (FACIT) Manual 中の Translational Project Procedures and Guidelines に定められている翻訳手順にのっとって翻訳作業が行われることが決められている⁷⁾ (表 1)。具体的には、FACT-G 29 項目にバイオセラピー専用の additional concern 13 項目を追加した 42 項目の翻訳となるが、すでに FACT-G 29 項目の日本語翻訳版が完成していることより、バイオセラピー専用スケール 13 項目の翻訳を行い、FACT-G 日本語版に付加する形となる。まず、東日本癌免疫療法研究会会員で 3 年以上の米国在住経験を有する 2 名の日本人医師により英語原版の日本語翻訳が行われ、二つの翻訳文を医学知識、免疫学的知識、英語知識を有する別の日本人医師が一つにまとめたものを米国 CORE へ提出した。次に、現地の日本語に精通した英語 native speaker により日本語翻訳文を英語に翻訳する back translator を行い、できあがった英文と英語原版との相違を解析した結果、差異がないと認められ、日本語翻訳版原案が完成した。この日本語翻訳版原案を使って、福島県立医科大学病院、山梨大学医学部附属病院、東京女子医科大学病院にて合計 15 名のバイオセラピーを受けている癌患者に対して FACT-BRM

表1 FACT-BRM 日本語翻訳作業行程

1. 2名の日本人によるFACT-BRM 英語版の日本語翻訳 (forward translation)
2. 二つの日本語翻訳文を別の日本人が一つにまとめる (reconciliation)
3. 英語 native speaker により日本語翻訳文を英訳する (back translator)
4. 両国語に精通した3,4名により英語翻訳文と原文を比較する (independent reviews)
5. 日本語翻訳文の原案完成 (finalization)
6. 文章のつづりと文法を確認する
7. パイロット試験 (15例) を実施し, 質問文の適切性を評価する
8. FACT-BRM 日本語翻訳版の完成

表2 パイロット試験対象患者の背景

性	N	PS	N	原疾患	年齢
男性	9	0	8	大腸癌	5
女性	6	1	6	胃癌	3
				肝細胞癌	3
				肝内胆管癌	2
				食道癌	1
				胆道癌	1
					平均 60.9

表3 FACT-BRM 調査表各尺度の記述統計量と内的整合性

尺度	平均スコア	標準偏差	α 係数
身体症状	21.73	6.13	0.89
社会・家族関係	21.22	6.56	0.78
精神的状態	15.23	4.00	0.75
活動状況	16.27	8.28	0.93
BRM 身体症状	21.27	3.77	0.56
BRM 心理状態	16.80	4.39	0.81
Total	112.52	24.13	0.88

アンケート調査のパイロット試験を実施し, 日本語翻訳文の適切性を解析した。本パイロット試験は実施3施設において倫理委員会にて実施承認を得て実施されている。対象は癌の告知を受け, バイオセラピーを受けている患者で, 本研究の目的および内容を文章にて説明を受け, 試験参加の同意が得られた15人に実施された。方法は, FACT-BRM 日本語翻訳版原案によるQOLアンケート調査を1回実施し, 調査票の各質問項目に対してごく最近(過去7日間程度)の症状を「0. まったくあてはまらない」「1. わずかにあてはまる」「2. 多少あてはまる」「3. かなりあてはまる」「4. 非常によくあてはまる」のなかから回答してもらい, さらに各質問項目について, 理解しにくい質問事項, 関係のないと思われる質問事項, 足りないと思われる質問事項などを記載してもらった。この結果を米国COREの多国語翻訳担当委員に提出して解析が行われた。

II. 結 果

Translational Project Procedures and Guidelines にのっとった翻訳作業行程を経て, FACT-BRM 日本語翻訳版原案が作成された。本邦にてインターフェロン療法や活性化リンパ球療法などのバイオセラピーを受けている15名の癌患者(男性9名, 女性6名)に対して, FACT-BRM 日本語翻訳版原案によるQOLアンケート調査のパイロット試験が実施された。対象患者の背景は, 年齢は36~81歳で平均60.9歳, 疾患別では大腸癌5例, 胃癌3例, 肝細胞癌3例, 肝内胆管癌2例, 食道癌1例, 胆道癌1例であった。各患者の performance status (PS) はPS 0が8名, PS 1が6名, PS 3が1名であった(表2)。アンケート調査回答結果の各尺度における平均スコアと標準偏差は表3のごとくであり, 内的整合性を表すCronbachの α 係数はBRM身体面の0.56以外では0.75~0.93, 全体で0.88と高値を示した。また, アンケート質問項目中に理解しにくい

表4 FACT-BRM (Version 4) 日本語版

身体症状について

1. 体に力が入らない感じがする。
2. 吐き気がする。
3. 体の具合のせいで家族への負担となっている。
4. 痛みがある。
5. 治療による副作用に悩んでいる。
6. 自分は病気だと感じる。
7. 体の具合のせいで、床（ベッド）で休まざるを得ない。

社会的・家族との関係について

1. 友人たちを身近に感じる。
2. 家族を親密に感じる。
3. 家族から精神的な助けがある。
4. 友人からの助けがある。
5. 家族は私の病気を充分受け入れている。
6. 私の病気について家族間の話し合いに満足している。
7. 私は病気であるが、家族の生活は順調である。
8. パートナー（または自分を一番支えてくれる人）を親密に感じる。
9. 性生活に満足している。（無回答でも可）

精神的状態について

1. 悲しいと感じる。
2. 病気を冷静に受け止めている自分に満足している。
3. 病気と闘うことに希望を失いつつある。
4. 神経質になっている。
5. 死ぬことを心配している。
6. 病気の悪化を心配している。

活動状況について

1. 仕事（家のことも含む）をすることができる。
2. 仕事（家のことも含む）は生活の張りになる。
3. 生活を楽しむことができる。
4. 自分の病気を充分受け入れている。
5. よく眠れる。
6. いつもの娯楽（余暇）を楽しんでいる。
7. 現在の生活の質に満足している。

その他心配な点 身体症状について

1. 疲れやすい。
2. 体全体が弱っていると感じる。
3. 健康な食欲がある。
4. 関節に痛みを感じる。
5. 寒けがして困っている。
6. 熱が出て困っている。
7. 汗が出て困っている。

その他心配な点 心理状態について

1. ものごとに集中しにくい。
2. ものごとを思い出すのに苦勞する。
3. 気分が沈みやすい。
4. イライラしやすい。
5. 気持ちに浮き沈みがある。
6. 何かしようという意欲がある。

もの、関係のないものは指摘されず、他に必要な項目も追加されなかった。以上の結果を米国 CORE へ提出し、FACIT Translation Manual にのっとった解析を経て、FACT-BRM 日本語翻訳文原案が適切であるとの結論を得て、FACT-BRM (Version 4) 日本語版が完成した (表4)。現在、完成した FACT-BRM 日本語版は FACIT のインターネットホームページ (<http://www.facit.org/>) より所定の利用登録を経て使用可能となっている。

Ⅲ. 考 察

FACIT や EORTC QLQ-C30 などの海外で開発された QOL 調査票を日本語に翻訳して利用することは、臨床試験などにおける outcomes を国際的スケールで評価することを可能とするが、海外で確かめられている計量心理学的信頼性・妥当性が日本でも保たれているかどうかを検証することが必要となる^{8,9)}。FACT-BRM 日本語版はパイロット試験結果の解析における信頼性はおおむね良好であったものの、今後症例数を増やした臨床試験にて信頼性・妥当性の検討が必要である。さらに、今回開発した FACT-BRM は、開発元の米国では主にバイオセラピーとしてインターフェロン療法を受けた患者を対象とすることが多い¹⁰⁾。これに対して本邦では、インターフェロン療法以外に BRM 製剤であるレンチナン、PSK、OK-432 などが臨床医療で多数使用されている他、活性化自己リンパ球や樹状細胞などを用いた免疫細胞療法の臨床研究も精力的に進められており、これらのバイオセラピー実施患者における QOL 評価尺度として FACT-BRM 日本語版が最も適しているかどうかについての臨床的妥当性 (clinical validity, responsiveness) を評価することが重要と考えられる。

現在、FACT-BRM のアンケート項目は 42 項目であり、他の QOL アンケート調査票と比較すると質問項目数が多い部類に入る。たとえば、化学療法に利用される栗原班の QOL-ACD では 21 項目とフェイススケール、国際的な EORTC QLQ-C30 で 30 項目である。そのため、PS 3 以上の患者ではアンケート調査自体が QOL を損なう原因になりかねない。また、精神状態や心理社

会不安状態の項目については治療による直接的な QOL を評価するものではなく、臨床試験のポイントとして適さないことも考えられる。これらの課題を改善してよりの確に臨床試験の outcomes を評価する手法として、FACIT では元の FACIT スケールより精神状態や心理社会不安状態の質問を除いて、身体的、活動性評価に特化した臨床試験用スケール FACT-TOI (trial outcome index) の利用を可能としている。FACT-BRM の場合を考えると、癌免疫療法の臨床試験における QOL の推移を評価する目的であれば、FACT-BRM を基盤として質問項目を 27 項目に減らした FACT-TOI の利用も可能となる。これにより、患者への負担軽減とスコア計算の簡素化も利点としてあげられる。以上、今後踏み固めていくステップは多いものの、癌免疫療法における QOL の改善を評価するために FACT-BRM 日本語版を利用した解析が有用となることを期待したい。

おわりに

癌に対するバイオセラピーの臨床試験や実地医療において患者の QOL を客観的に評価することが重要となっており、その評価のために、バイオセラピーに特化した FACT-BRM 日本語版を開発した。今後、本邦における信頼性・妥当性の検討が必要であるが、FACT-BRM 日本語版を利用した QOL 解析が有用となることが期待される。

文 献

- 1) Cella, D.F., Tulsky, D.S., Gray, G., *et al.*: The Functional Assessment of Cancer Therapy (FACT) Scale: Development and validation of the general measure. *J. Clin. Oncol.* 11: 570-579, 1993.
- 2) Aaronson, N.K., Ahmedzai, S., Bergman, B., *et al.*: The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: A quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 365-376, 1993.
- 3) Kurihara, M., Shimizu, H., Tsuboi, K., *et al.*: Development of quality of life questionnaire in Japan: Quality of life assessment of cancer patients receiving chemotherapy. *Psychol. Oncol.* 8: 355-363, 1999.
- 4) Cella, D., Bonomi, A.E., Lloyd, S.R., *et al.*: Reliability and validity of the Functional Assessment of Cancer Therapy-Lung (FACT-

- L) quality of life instrument. *Lung Cancer* 2: 199-220, 1995.
- 5) Brady, M.J., Cella, D.F., Mo, F., *et al.*: Reliability and validity of the Functional Assessment of Cancer Therapy-Breast (FACT-B) quality of life instrument. *J. Clin. Oncol.* 15: 974-986, 1997.
- 6) Bacik, J., Mazumdar, M., Fairclough, D.L., *et al.*: The Functional Assessment of Cancer Therapy-BRM (FACT-BRM) : A new tool for the assessment of quality of life in patients treated with biologic response modifiers. *Qual. Life Res.* 13(1) : 137-154, 2004.
- 7) Cella, D.: FACIT manual Version 4.
- 8) Fujimoto, H., Kobayashi, K., Chang, C.H., *et al.*: Cross-cultural validation of an international questionnaire, the General Measure of the Functional Assessment of Cancer Therapy scale (FACT-G), for Japanese. *Qual. Life Res.* 10(8) : 701-709, 2001.
- 9) Noguchi, N., Ohno, T., Morita, S., *et al.*: Reliability and validity of the Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Spiritual (FACT-Sp) for Japanese patients with cancer. *Support. Care Cancer* 12: 240-245, 2004.
- 10) Motzer, R.J., Murphy, B.A., Bacik, J., *et al.*: Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 18(16) : 2972-2980, 2000.

Postoperative immunosuppression cascade and immunotherapy using lymphokine-activated killer cells for patients with esophageal cancer: Possible application for compensatory anti-inflammatory response syndrome

YOSHIYUKI YAMAGUCHI, JUN HIHARA, KATSUJI HIRONAKA, AKIKO OHSHITA, RIKI OKITA, MAKOTO OKAWAKI, KAZUO MATSUURA, ICHIRO NAGAMINE, TAKUHIRO IKEDA, MASAHIRO OHARA and YOICHI HAMAI

Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Kasumi 1-2-3, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

Received September 26, 2005; Accepted November 23, 2005

Abstract. Immunological parameters were measured in order to elucidate a postoperative immunosuppression mechanism in transthoracic esophagectomy for patients with esophageal cancer. Moreover, lymphokine-activated killer (LAK) cells were transferred just after the surgery to overcome the postoperative immunosuppression. Fifteen consecutive patients who underwent transthoracic esophagectomy were subjected to the postoperative measurement of immunological parameters. Ten patients who underwent open cholecystectomy served as controls. Heparinized venous blood was obtained pre- and postoperatively, and serum levels of cytokines IL-6 and IL-10 and immunosuppressive acidic protein (IAP) were measured. Peripheral blood lymphocytes were harvested and analyzed by flow cytometry for phenotype detection and by a mixed lymphocyte reaction for detecting concanavalin (Con)-A-induced or -non-induced suppressor activity. Another 29 consecutive patients who underwent transthoracic esophagectomy were randomly enrolled in a postoperative immunotherapy trial either with or without lymphokine-

activated killer cells. It was found that, in the esophagectomy group, IL-6 and IL-10 increased postoperatively and peaked on day 1, followed by an increase in IAP, peaked again on day 4, with a profound decrease in helper and cytotoxic T-cell subsets, followed by increases in Con-A-induced (on day 7 or later) and spontaneous (on day 10) suppressor activities. These changes were minimal in the cholecystectomy group. LAK cell transfer restored the postoperative decrease in the helper and cytotoxic T-cell population, and there was a trend of reduction for postoperative remote infection such as pneumonia and surgical site infection in the LAK therapy group. Taken together, we would like to propose the existence of a postoperative immunosuppression cascade consisting of increases in cytokines and immunosuppressive proteins, decreases in helper and cytotoxic T-cell populations, and the development of suppressor T-cell activities in surgery for esophageal cancer. Postoperative adoptive transfer of LAK cells may be a novel clinical application in surgery for esophageal cancer as a means of treating this postoperative immunosuppressive condition that may be identical to the status of compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS).

Correspondence to: Dr Yoshiyuki Yamaguchi, Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Kasumi 1-2-3, Minami-Ku, Hiroshima 734-8553, Japan
E-mail: shogo@hiroshima-u.ac.jp

Introduction

Major thoraco-abdominal surgery, as represented by transthoracic esophagectomy, causes profound postoperative surgical stress, which can stimulate the production of pro-inflammatory cytokines, including TNF, IL-1 and IL-6, by immunocompetent cells (1). This condition, based on hypercytokinemia, was defined in 1991 through the consensus conference of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM), as systemic inflammatory response syndrome (SIRS) (2). On the other hand, an anti-inflammatory response is subsequently triggered by SIRS. This response is designated as compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) (3). The anti-inflammatory cytokine IL-10 is a representative mediator in CARS status (4). Postoperative host responses are therefore understood as being a balance of SIRS and CARS, but they have not been

Abbreviations: AIT, adoptive immunotherapy; CARS, compensatory anti-inflammatory response syndrome; CD, cluster of differentiation; Con-A, concanavalin-A; FITC, fluorescein isothiocyanate; IAP, immunosuppressive acidic protein; IL, interleukin; LAK, lymphokine-activated killer; MLR, mixed lymphocyte reaction; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PE, phycoerythrin; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte; TNF, tumor necrosis factor; T-reg, regulatory T cell

Key words: postoperative immunosuppression, compensatory anti-inflammatory response syndrome, esophageal cancer, adoptive immunotherapy, lymphokine-activated killer cells

fully explored in surgery for esophageal cancer. Moreover, an imbalance between these dual immune responses, with an overwhelming release of pro- or anti-inflammatory cytokines, seems to be responsible for organ dysfunction and increased susceptibility to infections (5). Medical regulation of SIRS and CARS has been conducted to improve these adverse effects, but the most desirable means of regulation remains under investigation (6-11).

The discovery and molecular cloning of the crucial lymphocyte growth factor, interleukin-2 (IL-2), has facilitated the clinical application of adoptive immunotherapy (AIT) for cancer using autologous lymphocytes activated *in vitro* with IL-2 (12). We have carried out *ex vivo* cell therapy for cancer treatment using activated autologous lymphocytes, including lymphokine-activated killer (LAK) cells, tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), and tumor-sensitized lymphocytes, but tumor responses are limited with regard to quality of life in locoregional administration for malignant effusion from gastrointestinal cancers (13). Ueda *et al* have reported an efficacy of AIT using LAK cells for metastatic esophageal cancer (14). The clinical trials using postoperative LAK cell transfer have demonstrated survival benefits in hepatocellular carcinoma (15) and lung cancer (16). However, the effects of AIT using LAK cells for postoperative stress status, SIRS and CARS have not yet been demonstrated.

In the present study, we explored the postoperative immunosuppression cascade in esophageal cancer surgery. Moreover, we conducted postoperative LAK therapy for patients with esophageal cancer and found that this therapy may be a possible therapeutic application for the postoperative immunosuppressive condition, CARS.

Materials and methods

Patients. Fifteen consecutive patients with histologically proven esophageal squamous cell carcinoma who underwent trans-thoracic esophagectomy were subjected to postoperative immunosuppression measurements, and 10 patients with open cholecystectomy served as controls. Another 29 consecutive patients with esophageal cancer were enrolled in the adjuvant LAK therapy study after sufficient written informed consent. The protocol was approved by the institutional review board. The patients were randomly assigned to either the standard therapy group or the LAK therapy group.

Collection of blood samples and lymphocytes. Heparinized venous blood was obtained from patients and healthy volunteers, and buffy coat and plasma were immediately separated by centrifugation (2,000 rpm, 30 min). The supernatant was subjected to measurements of cytokines and immunosuppressive acidic protein (IAP). The buffy coat was resuspended in RPMI-1640 medium, and the suspension was layered on Ficoll-Conray. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by gradient centrifugation (2,000 rpm, 30 min), washed twice, and resuspended in the medium containing 2% AB serum at a density of $1 \times 10^6/\text{ml}$.

Cytokines and acute inflammatory proteins. Collected plasma samples were subjected to the measurement for IL-6, IL-10 and immunosuppressive acidic protein (IAP). IL-6 and IL-10

were measured using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN). IAP was measured by the SRL Co., Tokyo.

Flow cytometry. Fifty microliters each of the lymphocyte suspension (5×10^5) were stained with antibodies, washed, and then analyzed on a Cytoron (Ortho Diagnostic Systems, USA). The antibodies used were fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD4 and -CD8 antibodies, phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD45RA and -CD11b antibodies. All antibodies used were purchased from Becton-Dickinson, San Diego, CA.

Suppressor activity. A one-way mixed lymphocyte reaction (MLR) was performed as described in detail elsewhere (17). In brief, PBMCs were stimulated with 0 or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concanavalin-A (Con-A, Boehringer, Germany) for 24 h at 37°C. Cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mitomycin-C for 1 h at 37°C, washed 3 times, and resuspended in the medium as effector cells ($5 \times 10^5/\text{ml}$). Responder PBMCs ($5 \times 10^5/\text{ml}$) were collected from healthy subjects. Effector and responder cells (1:1) were co-cultured in RPMI-1640 medium containing 2% AB serum for 4 days at 37°C in the presence of 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phytohemagglutinin (Difco, USA). Cells were pulsed with 5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H -thymidine and incubated for another 8 h. Cells were harvested, and radioactivity was measured. Suppressor activity (SA) was calculated using the following formula: SA (%) = $\{1 - \text{MLR}(\text{cpm})/\text{responder cells alone}(\text{cpm})\} \times 100$.

LAK cell generation and postoperative transfer. Plasmapheresis was performed using Haemonetics V30 (Haemonetics Corp., Braintree, MA) to harvest patients' white blood cells (WBCs) 2 weeks and 1 week before surgery. PBMCs were collected from WBCs by centrifugation. LAK cells were generated by culturing PBMCs ($10^6/\text{ml}$) for 2 weeks in RPMI-1640 medium containing 2% autologous serum and 400 U/ml IL-2 (Sionogi, Tokyo) supplemented with 2 mM l-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. The culture medium was half-changed with fresh medium containing IL-2 every 3-4 days. LAK cells ($1-3 \times 10^9$ cells) were washed 3 times by saline, filtered through 200 μm mesh, resuspended in 100 ml saline, and administered intravenously twice a week (up to 6 times), postoperatively. Bacterial and endotoxin examinations were made 3 days before and on the day of administration.

Statistical analysis. Statistical analysis was conducted by the χ^2 test or Student's t-test using StatView software (Version 5) on a Macintosh computer. All values are presented as mean \pm standard deviation, and $p < 0.05$ was defined as statistically significant.

Results

Patients for postoperative measurements of immunological parameters. The esophagectomy (EG) group included 15 patients consisting of 11 men and 4 women, with a mean age of 58 years (Table I). In the cholecystectomy (CC) group, there were 3 men and 7 women whose mean age was 55. There was a significant difference between the EG and CC

Table I. Patients for postoperative measurements of immunological parameters.

Categories	Group	
	Cholecystectomy	Esophagectomy
Gender		
Male	3	11
Female	7	4
Age (mean ± SD)	55±11	58±10
Operation time (min, mean ± SD)	97±17	379±75
Blood loss (g, mean ± SD)	181±102	570±210

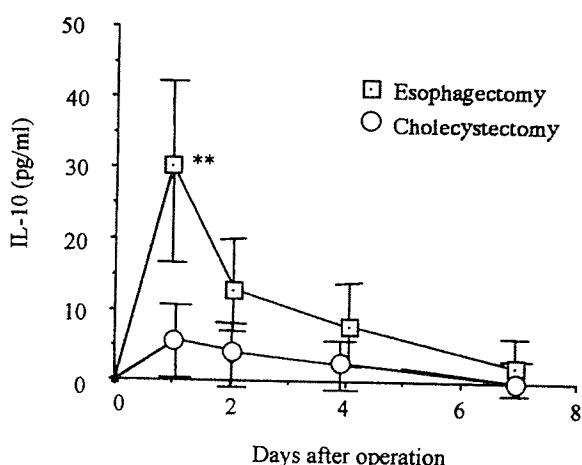
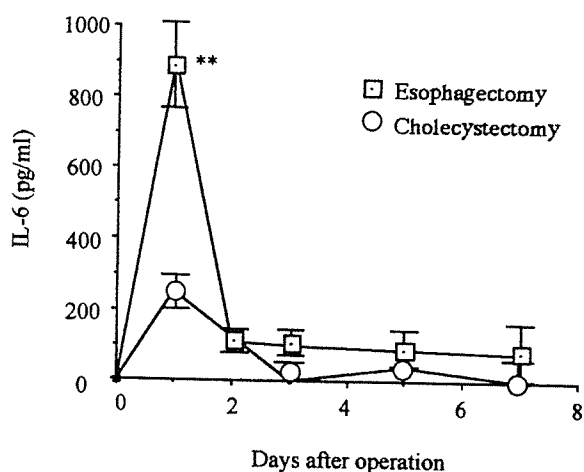


Figure 1. Postoperative changes in serum IL-6 and IL-10. Serum samples were postoperatively collected from patients who underwent transthoracic esophagectomy or open cholecystectomy, and IL-6 and IL-10 levels were measured. A significant difference, **p<0.01.

groups with regard to gender (p<0.05). Operative time and blood loss were 378 min and 570 g for the EG group, and 97 min and 181 g for the CC group, respectively. There were significant differences in these values (p<0.05).

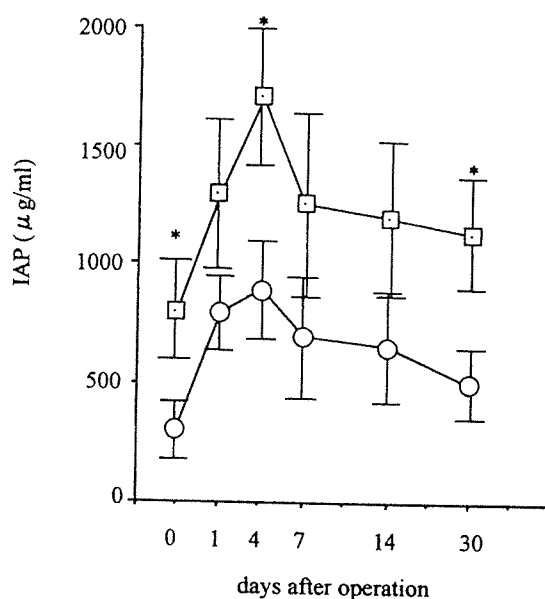


Figure 2. Postoperative changes in serum IAP. Serum samples were postoperatively collected from patients who underwent transthoracic esophagectomy or open cholecystectomy, and IAP levels were measured. Significant differences, *p<0.05.

Postoperative changes in serum IL-6 and IL-10 in patients with esophageal cancer. Postoperative cytokine levels were investigated (Fig. 1). Serum levels of IL-6 increased postoperatively, peaked on day 1, and then decreased. Serum levels of IL-10 fluctuated similarly with those of IL-6. Significant increases of IL-6 and IL-10 were observed on day 1 in the EG group compared with the CC group (p<0.01).

Postoperative changes in serum IAP. Postoperative changes in IAP, an acute-phase reactant protein, were investigated (Fig. 2). Serum levels of IAP increased postoperatively, peaked on day 4, and then decreased. Significant increases in IAP were observed before surgery, on day 4, and still on day 30 in the EG group compared with the CC group (p<0.05).

Postoperative changes in helper and cytotoxic T cell population. Postoperative changes in functional lymphocyte subsets, including the CD4⁺CD45RA⁻ helper subset and the CD8⁺CD11b⁻ cytotoxic T-cell subset, were investigated (Fig. 3). Changes in the helper and cytotoxic T-cell subsets were minimal in the CC group. In the EG group, however, levels of the helper subset significantly decreased compared with those in the CC group on day 1, continuing through day 14, and recovering, to a lesser extent, but still remaining at low levels on day 30 (p<0.05). The changes in the cytotoxic T-cell subset in the EG group were very similar to those of the helper subset.

Postoperative changes in suppressor activity. Con-A-induced and -non-induced (spontaneous) suppressor activities were

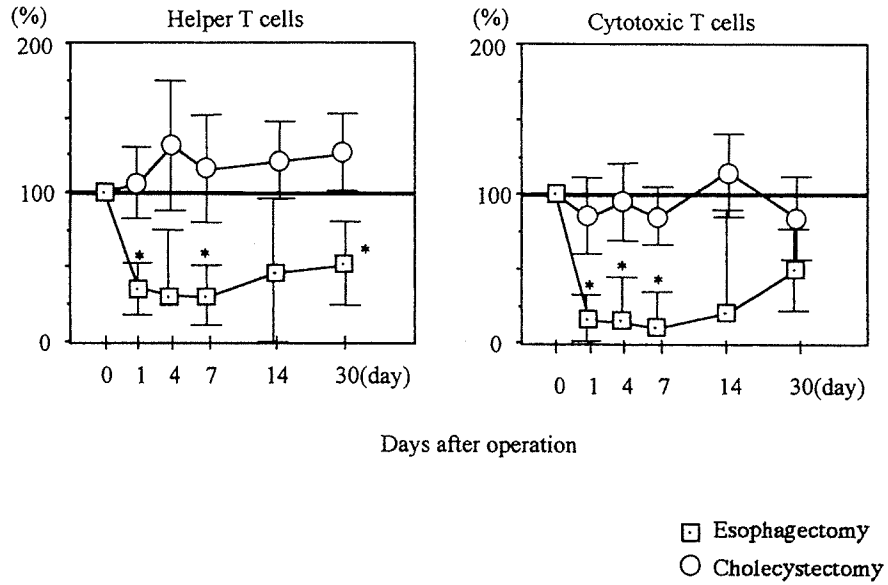


Figure 3. Postoperative changes in helper and cytotoxic T-cell subsets. PBMCs were postoperatively collected from patients who underwent transthoracic esophagectomy or open cholecystectomy, and helper and cytotoxic T-cell subsets were measured by flow cytometry. Significant differences, * $p < 0.05$.

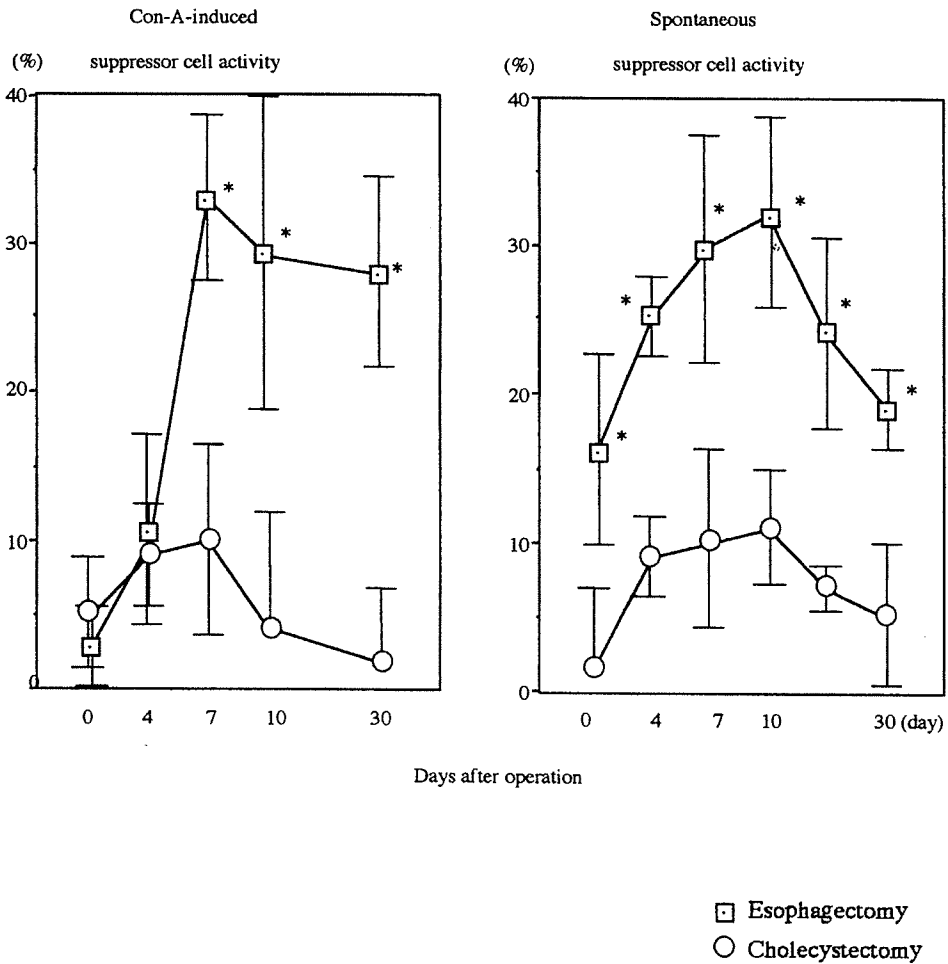


Figure 4. Postoperative changes in suppressor activities. PBMCs were postoperatively collected from patients who underwent transthoracic esophagectomy or open cholecystectomy, and suppressor activities were measured as described in Materials and methods. Significant differences, * $p < 0.05$.

investigated (Fig. 4). Con-A-induced suppressor activity significantly increased in the EG group, peaked on day 7, then gradually decreased but still remained high on day 30 ($p < 0.05$). Con-A-non-induced spontaneous suppressor

Table II. Esophageal cancer patients received postoperative adjuvant LAK therapy.

	LAK therapy	
	(-), n=15	(+), n=14
Gender		
Male	13	14
Female	2	0
Age, range (mean)	47-77 (61.8)	49-69 (56.8)
Stage		
0	4	1
1	0	1
2	1	2
3	6	6
4	4	4
LAK cell number (range, median)	-	1.1-12.6 (4.5×10^9)
No. of transfer (range, median)	-	3-6 (4)

activity also increased significantly in the EG group, but peaked on day 10, and decreased thereafter ($p < 0.05$). These changes were minimal in the CC group.

Patients with esophageal cancer who received postoperative adjuvant LAK therapy. Twenty-nine patients who underwent transthoracic esophagectomy were randomly treated postoperatively with or without LAK cell transfer. Patient characteristics are shown in Table II. There were no significant differences between LAK (+) and (-) groups in terms of gender, age or tumor stage. LAK cells were transferred safely postoperatively approximately four times with a total dose of 4.5×10^9 cells (median).

Table III. Postoperative infections after esophagectomy with or without LAK therapy.

Infection	LAK	
	(-), n=15	(+), n=14
(-)	10	12
(+)	5	2
Pulmonary	3	2
Wound	2	0

Patients who underwent transthoracic esophagectomy were treated either with or without postoperative LAK cell transfer. The incidence of postoperative pneumonia and wound infections was evaluated. The statistical difference between the LAK(+) and LAK(-) groups was $p = 0.09$.

Effects of postoperative LAK therapy on changes in helper and cytotoxic T-cell subsets. Effects of LAK cell transfer on the postoperative changes in helper and cytotoxic T cell subsets were studied (Fig. 5). Levels of the helper subset decreased postoperatively, as mentioned above for the LAK(-) group. This decrease in levels of the helper subset was almost abrogated with postoperative LAK cell transfer. As for the cytotoxic T-cell subset, postoperative LAK therapy restored the decrease in the subset, similarly to the effects of the helper subset. Significant differences were observed between LAK(-) and LAK(+) groups with regard to the percentage of postoperative helper T-cell and cytotoxic T-cell populations ($p < 0.05$).

Postoperative infection after esophagectomy with or without LAK therapy. Postoperative pulmonary and wound infections were evaluated (Table III). In the LAK(-) group, 3 and 2 of 15 patients developed pneumonia and wound infection, respectively. In contrast, only 2 of 14 patients developed pneumonia in the LAK(+) group, and no wound infection was

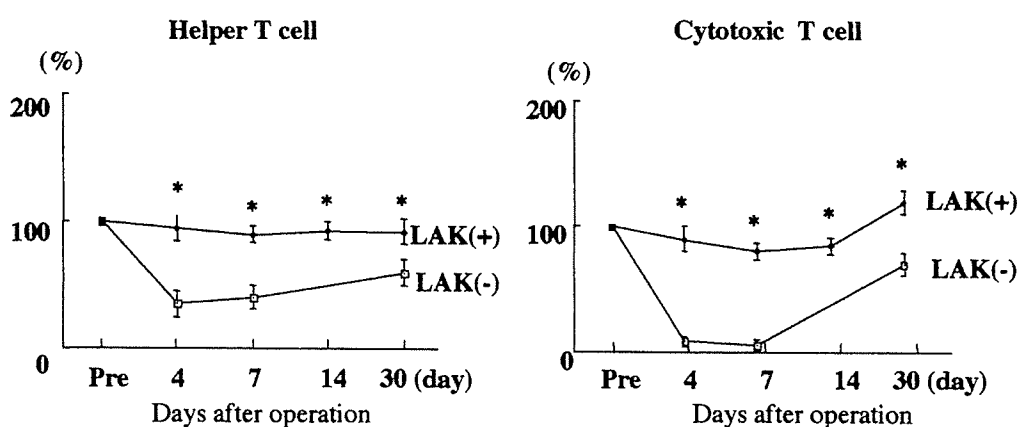


Figure 5. Effects of postoperative LAK therapy on changes in helper and cytotoxic T-cell subsets. LAK cells were prepared preoperatively. Patients who underwent transthoracic esophagectomy were treated either with or without postoperative LAK cell transfer. PBMCs were collected postoperatively, and helper and cytotoxic T cell subsets were measured in each group by flow cytometry. Significant differences, $*p < 0.05$.

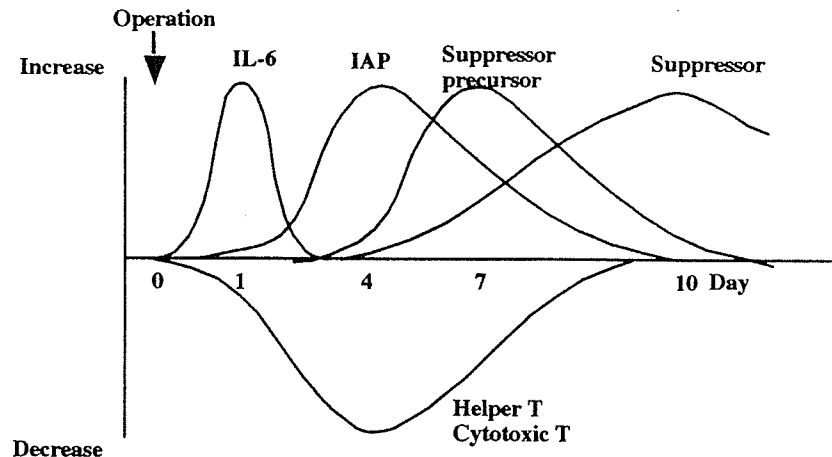


Figure 6. A proposal regarding the postoperative immunosuppression cascade. A postoperative immunosuppression cascade appears to exist that starts from increases in inflammatory cytokines, followed by increases in immunosuppressive proteins, decreases in helper and cytotoxic T-cell populations, and the development of suppressor cell activities, all of which contribute to the emergence of CARS in surgery for esophageal cancer.

observed. There was a trend of reductive effects on infections in the LAK(+) groups ($p=0.09$).

Discussion

We investigated postoperative changes in immunological parameters in order to elucidate the influences of surgical stress and host responses after transthoracic esophagectomy. It was found that levels of proinflammatory cytokine IL-6 and anti-inflammatory cytokine IL-10 increased postoperatively and peaked on day 1, followed by an increase in acute-phase reactant protein IAP, peaked on day 4, with a profound decrease in levels of helper and cytotoxic T-cell subsets, followed by increases in Con-A-induced and spontaneous suppressor activities. IL-6 has been reported to induce acute-phase reactant proteins like C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein (18). IAP has been reported to be a member of the α 1-acid glycoprotein family (19). IAP also has been demonstrated to down-modulate CD4 molecules on the lymphocyte surface, leading to the establishment of cancer-associated immunodepression, and to induce suppressor-inducer cells (20). Con-A-induced suppressor cell activity has been reported to indicate the presence of suppressor precursor cells that mature in response to stimulation with suppressor inducer cells (17). Based on the above, we propose the existence of a postoperative immunosuppression cascade consisting of increases of cytokines, immunosuppressive proteins, decreases in helper and cytotoxic T-cell populations, and the development of suppressor T-cells (Fig. 6). All of these are triggered by the increase in inflammatory cytokines that induce humoral and cellular suppressive components.

In our postoperative immunosuppression cascade, suppressor cells are finally activated and differentiated. Recently, Sakaguchi *et al* (21) reported the existence of CD4⁺CD25⁺ new suppressor cells, designated as regulatory T (T-reg) cells. T-reg cells have been demonstrated to be involved in auto-immunity, tumor immunity, chronic infection and infertility. Murphy *et al* (22) have reported in a murine model that T-reg cells are involved in the suppression

of innate immunity after the stress of injury. Although we did not fractionate lymphocytes by using CD4 antigen in the MLR experiments, the Con-A-induced or spontaneous suppressor activities described herein may include, to some extent, CD4⁺CD25⁺ T-reg cell activity, as these suppressor activities have been shown to reside in CD4⁺CD62L⁺ cells (23). Moreover, it has been reported that the development of T-reg cells requires transforming growth factor (TGF)- β (24), and we have demonstrated TGF- β production by CD62L⁺ cells (23). Elias *et al* have reported the existence of an IL-6-TGF- β regulation system in a human fibroblast model (25). These results suggest that T-reg cells may also be involved in the postoperative immunosuppression cascade in the human system. This hypothesis remains to be tested further.

The postoperative immunosuppression cascade described herein may be matched with the compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS). The CARS is a reciprocal situation triggered by SIRS after surgical stress (3,4). The CARS can cause remote infections, including pneumonia, based on profound immunodepression, where IL-10 plays an important role (5). IL-10 is a T-helper type 2 cytokine (11). Through insights into the pathophysiological mechanisms of SIRS and CARS, strategies for the use of T-helper type 1 cytokines of G-CSF (8), GM-CSF (9), IFN- γ (10) and IL-12 (11), have been studied with regard to the treatment of CARS, but the clinical benefits remain under investigation. In our study, CARS was thought of as a depression of functional lymphocytes, including helper T cells and cytotoxic T cells. This perspective may indicate that adoptive transfer of activated lymphocytes, for example LAK cells, is of use. It has been reported that IL-2-activated peripheral blood LAK cells consist of CD4⁺ and CD8 cells as well as NK cells (26,27). Moreover, we have system for easily expanding LAK cells in our laboratory (13). Our preliminary clinical investigation showed that postoperative LAK cell transfer restores the decrease in helper and cytotoxic T-cell populations. Moreover, there has been a trend of reduction for postoperative remote infection and surgical site infection in the LAK therapy group. These results suggest that postoperative

adoptive transfer of LAK cells may be a novel clinical application for the treatment of CARS. A large clinical trial is now in progress for clarifying the anti-CARS effects of LAK therapy in patients with esophageal cancer.

Acknowledgements

We would like to thank Miss Y. Nakatani for her special help with the tissue culture.

References

- Dinarello CA: Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-508 2000.
- Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. *Crit Care Med* 20: 864-874, 1992.
- Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS. *Crit Care Med* 24: 1125-1128, 1996.
- Hensler T, Sauerland S, Bouillon B, Raum M, Rixen D, Helling HJ, Schein RM and Neugebauer EA: Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6, and interleukin-10 and polymorphonuclear neutrophil elastase. *J Trauma* 52: 962-970, 2002.
- Keel M and Trentz O: Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 36: 691-709, 2005.
- Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM and Benjamin E: Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein. Soluble TNF Receptor Study Group. *N Eng J Med* 334: 1697-1702, 1996.
- Lyons A, Goebel A, Mannick JA and Lederer JA: Protective effects of early interleukin 10 antagonism on injury-induced immune dysfunction. *Arch Surg* 134: 1317-1323, 1999.
- Gross-Weege W, Weiss M, Schneider M, Wenning M, Harms B, Dumon K, Ohmann C and Roher HD: Safety of a low-dosage Filgrastim (rhG-CSF) treatment in non-neutropenic surgical intensive care patients with an inflammatory process. *Intensive Care Med* 23: 16-22, 1997.
- Fanning NF, Kell MR, Shorten GD, Kirwan WO, Bouchier-Hayes D, Cotter TG and Redmond HP: Circulating granulocyte macrophage colony-stimulating factor in plasma of patients with the systemic inflammatory response syndrome delays neutrophil apoptosis through inhibition of spontaneous reactive oxygen species generation. *Shock* 11: 167-174, 1999.
- Kox WJ, Bone RC, Krausch D, Docke WD, Kox SN, Wauer H, Egerer K, Querner S, Asadullah K, von Baehr R and Volk HD: Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome: a new approach: proof of principle. *Arch Intern Med* 157: 389-393, 1997.
- O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA and Rodrick ML: Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 222: 482-490, 1995.
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT, Seipp CA, Simpson C and Reichert CM: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Eng J Med* 313: 1485-1492, 1985.
- Yamaguchi Y, Ohshita A, Kawabuchi Y, Ohta K, Shuimizu K, Minami K, Hihara J, Miyahara E and Toge T: Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes: current status and new strategies. *Human Cell* 16: 183-189, 2003.
- Ueda Y, Yamagishi H, Tanioka Y, Fujiwara H, Fuji N, Itoh T, Fujiki H, Yoshimura T and Oka T: Clinical application of adoptive immunotherapy and IL-2 for the treatment of advanced digestive tract cancer. *Hepatogastroenterology* 46: 1274-1279, 1999.
- Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Sakamoto M, Hirohashi S, Ohashi Y and Kakizoe T: Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 356: 802-807, 2000.
- Kimura H and Yamaguchi Y: A phase III randomized study of interleukin-2 lymphokine-activated killer cell immunotherapy combined with chemotherapy or radiotherapy after curative or non-curative resection of primary lung carcinoma. *Cancer* 80: 42-49, 1997.
- Toge T, Hamamoto S, Itagaki E, Yajima K, Tanada M, Nakane H, Kohno H, Nakanishi K and Hattori T: Concanavalin A-induced and spontaneous suppressor cell activities in peripheral blood lymphocytes and spleen cells from gastric cancer patients. *Cancer* 52: 1624-1631, 1983.
- Banks RE, Forbes MA, Storr M, Higginson J, Thompson D, Raynes J, Illingworth JM, Perren TJ, Selby PJ and Whicher JT: The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clin Exp Immunol* 102: 217-223, 1995.
- Shibata Y, Tamura K and Ishida N: Cultured human monocytes, granulocytes and a monoblastoid cell line (THP-1) synthesize and secrete immunosuppressive acidic protein (a type of alpha 1-acid glycoprotein). *Microbiol Immunol* 28: 99-111, 1984.
- Yamaguchi Y, Miyahara E, Funakoshi M, Takashima I, Kawami H, Sato Y and Toge T: Modulation of CD4 antigen expression on the lymphocyte surface by immunosuppressive acidic protein in cancer patients. *Oncology* 52: 1-6, 1995.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune disease. *J Immunol* 155: 1151-1164, 1995.
- Murphy TJ, Choileain NN, Zang Y, Mannick JA and Lederer JA: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury. *J Immunol* 174: 2957-2963, 2005.
- Noma K, Yamaguchi Y, Okita R, Matsuura K and Toge T: The spleen plays an immunosuppressive role in patients with gastric cancer: involvement of CD62L⁺ cells and TGF-beta. *Anti-cancer Res* 25: 643-649, 2005.
- Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR and Neurath MF: Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁺ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172: 5149-5153, 2004.
- Elias JA, Lentz V and Cummings PJ: Transforming growth factor-beta regulation of IL-6 production by unstimulated and IL-1-stimulated human fibroblasts. *J Immunol* 146: 3437-3443, 1991.
- Damle NK, Doyle LV and Bradley EC: Interleukin 2-activated human killer cells are derived from phenotypically heterogeneous precursors. *J Immunol* 137: 2814-2822, 1986.
- Sekine T, Shiraiwa H, Yamazaki T, Tobisu K and Kakizoe T: A feasible method for expansion of peripheral blood lymphocytes by culture with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody and interleukin-2 for use in adoptive immunotherapy of cancer patients. *Biomed Pharmacother* 47: 73-78, 1993.